

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R) File 347:JAPIO

(c) 1999 JPO &amp; JAPIO. All rts. reserv.

04944295

## DECOMPOSITION OF TRICHLENE

PUB. NO.: 07-236895 [J P 7236895 A]

PUBLISHED: September 12, 1995 (19950912)

INVENTOR(s): KAWAKAMI YASUSHI

KITAYAMA ATSUSHI

SUZUKI EIJI

KOIZUMI JUNICHI

MORITA HARUHIKO

APPLICANT(s): SANGYO SOUZOU KENKYUSHO [000000] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

APPL. NO.: 06-030614 [JP 9430614]

FILED: February 28, 1994 (19940228)

INTL CLASS: [6] C02F-003/34; C02F-003/00; C07C-021/10; C12N-001/20; C12N-001/20; C12R-001/385

JAPIO CLASS: 28.1 (SANITATION -- Sanitary Equipment); 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 32.2 (POLLUTION CONTROL -- Waste Water Treatment)

## ABSTRACT

PURPOSE: To efficiently and economically decompose Trichlene (trichloroethylene) by aerobically culturing bacteria having Trichlene decomposition capacity on a Trichlene-containing culture medium.

CONSTITUTION: Bacteria (e.g. *Pseudomonas aeruginosa* JI 104) having Trichlene decomposition capacity are aerobically cultured on a Trichlene-containing culture medium. The bacteria used herein are obtained from soil by screening. The culture medium used herein contains glucose as a carbon source and ammonium salt or nitrate as a nitrogen source. As inorganic salts, metal salts, for example, common salt, phosphate, calcium salt, iron, magnesium salt or the like are appropriately used. The concentration of Trichlene contained in the culture medium is preferably about 10mg/l. In this method, when Trichlene is decomposed by using bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*, benzene, toluene or xylene is added to the pre-culture of the bacteria in order to induce a Trichlene decomposing enzyme group.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-236895

(43)公開日 平成7年(1995)9月12日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 2 F 3/34	Z A B Z			
3/00	Z A B G			
// C 0 7 C 21/10		9280-4H		
C 1 2 N 1/20	A	8828-4B		
(C 1 2 N 1/20				

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-30614

(22)出願日 平成6年(1994)2月28日

特許法第30条第1項適用申請有り 1993年8月30日、社団法人化学工学会発行の「1993年化学工学会第26回秋季大会 講演論文集」に発表

(71)出願人 000173647

財団法人産業創造研究所

東京都文京区湯島1丁目6番8号

(72)発明者 川上 泰

東京都文京区湯島一丁目6番8号 財団法人 産業創造研究所内

(72)発明者 喜多山 篤

東京都世田谷区松原1-15-7

(72)発明者 鈴木 栄二

東京都文京区弥生2-4-11

(72)発明者 小泉 淳一

千葉県松戸市古ヶ崎4-3615-11

(74)代理人 弁理士 田澤 博昭 (外1名)

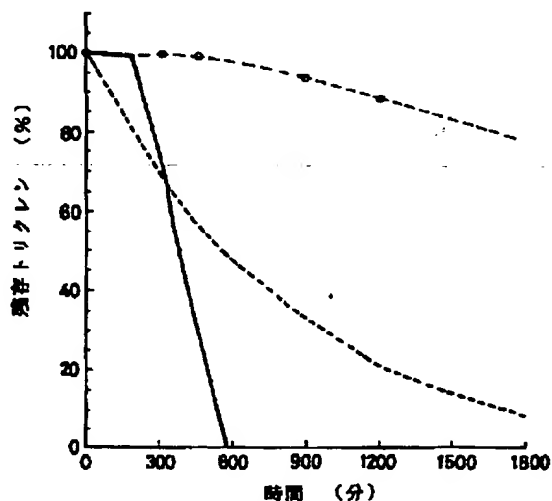
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トリクレンの分解方法

(57)【要約】

【目的】 効率的で経済的なトリクレンの分解方法を提供することを目的とする。

【構成】 トリクレンを含有する培地で、トリクレン分解能力を有するシュードモナス、アエルギノサJ I I 0 4を好氣的に培養して、培地中のトリクレンを分解する。トリクレンを分解する酵素群を合成するためにトルエン等の芳香族炭化水素を培地に添加する。シュードモナス、アエルギノサJ I I 0 4は、トリクレン分解速度が速い。



—— 前 養, 本培養でトルエン有

----- 前培養でトルエン有, 本培養でトルエン無

---○--- 前 養, 本培養でトルエン無

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 トリクレンを含有する培地で、トリクレン分解能力を有する微生物を好氣的に培養することを特徴とするトリクレンの分解方法。

【請求項2】 前記微生物がシュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 であることを特徴とする請求項1記載のトリクレンの分解方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、微生物によるトリクレンの分解方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 トリクレン（トリクロロエチレン）は揮発性の塩素化合物であり、溶媒や脱脂剤として使用できるため、広く工業的に用いられている。しかしながら、トリクレンは発癌性を有すると考えられているため、廃水等によるトリクレンの土壌や地下水への汚染が問題となっている。廃水中のトリクレンもしくは低沸点有機塩素系溶剤を処理するための技術はこれまであまり検討されたことがなく、僅かに高沸点の炭化水素を用いてトリクレンを抽出して除去する方法がある程度である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 トリクレンを除去する方法はあまり検討されてなく、かつ従来のトリクレンを除去する方法はコストが高く経済的でないなどの問題点があった。この発明は上記のような問題点を解消するためになされたもので、効率的で経済的なトリクレンの分解方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 請求項1の発明に係るトリクレンの分解方法は、トリクレンに作用してトリクレンを分解する能力（トリクレン分解能力）を有する微生物を、トリクレンを含有する培地で、好氣的に培養するようにしたものである。

【0005】 請求項2の発明に係るトリクレンの分解方法は、請求項1記載の方法で用いる微生物としてシュー

2

ドモナス、アエルギノサ J I 1 0 4（生命工学工業技術研究所寄託第12180号）を用いたものである。

【0006】 本発明で用いる微生物は、土壌からスクリーニングして得られたものであり、トリクレン分解能力を有する微生物であれば特に限定されないが、例えば好適な微生物としてシュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 が挙げられる。本発明で使用する培地は、炭素源としてはぶどう糖等が、窒素源としてはアンモニウム塩、硝酸塩等が用いられる。無機塩類としては、例えば、食塩、磷酸塩、カルシウム塩、鉄、マグネシウム塩などの金属塩類が適宜用いられる。培地に含まれるトリクレンの濃度は約10mg/l程度が好ましい。本発明においてシュードモナス属の微生物を用いてトリクレンを分解する際には、これらの微生物の前培養でベンゼン、トルエンもしくはキシレンをトリクレン分解酵素群の誘導のため加える。培養は、通常約30℃前後の温度で震とう又はエアレーション等の好氣的条件下で約10時間～1週間行う。

【0007】

【作用】 請求項1の発明におけるトリクレンの分解方法は、トリクレン分解能力を有する微生物をトリクレンを含有する培地で好氣的に培養するので、微生物がトリクレンを分解することが可能になる。

【0008】 請求項2の発明におけるトリクレンの分解方法は、トリクレン分解能力を有するシュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 をトリクレンを含有する培地で好氣的に培養するので、シュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 がトリクレンを分解することが可能になる。

【0009】

30 【実施例】

（シュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 の同定） 本発明で用いる微生物の J I 1 0 4 株は本発明者らが日本各地より採取した多種類の土壌からのスクリーニングにより見出した。その菌学的性質を表1～表3に示す。

【0010】

【表1】

J1104 シュードモナス シュードモナス シュードモナス				
アエルギノサ ステュゼリ メンドシナ				
グラム染色	陰性	陰性	陰性	陰性
運動性	+	+	+	+
べん毛	極(1)	極	極	極
蛍光色素	-	d	-	-
ピオシアニン	-	d	-	-
カロチノイド色素	-	-	-	+
41℃での成長	+	+	+	+
オキシダーゼ反応	+	+	+	+
脱窒	+	+	+	+
ゼラチン加水分解	-	+	-	-
スターチ加水分解	-	-	+	-
GC含量	66.3%	66.8-68%	62%	62.8-64.3%
生育:				
アラビノース	-	-		
セロビオース	-	-		
グルコース	+	+	+	+
ガラクトース	+	-		
ラクトース	-	-		
レブロース	+			
マルトース	-	-	+	-
マンノース	-	-		
メリビオース	-			
ラフィノース	-			
ラムノース	-	-		

【表2】

	5		6
J1104	シュードモナス アエルギノサ	シュードモナス ステューゼリ	シュードモナス メンドシナ
生育:			
スクロース	-	-	+
トレハロース	-	-	-
キシロース	-	-	-
アドニトール	-	-	-
ダルシトール	-	-	-
イノシトール	-	-	-
マンニトール	-	+	d
グリセロール	+	+	+
ソルビトール	-	-	-
サリシン	-	-	-
クエン酸塩	+	+	+
マロン酸塩	-	+	-
エスクリン	-	-	-
フェニルアラニン	-	d	-
アルギニン	+	+	-
リジン	-	+	+
オルニチン	-	-	-
L-マレイン酸塩	+	d	+
酒石酸塩	-	-	-
琥珀酸塩	+	+	+
ベタイン	+	+	-
サルゴシン	+	d	-
ガラニオール	+	+	-
$\beta$ -アラニン	+	+	-

【表3】

J1104	シュードモナス アエルギノサ	シュードモナス ステューゼリ	シュードモナス メンドシナ
生育:			
L-セリン	-	d	d
チロシン	+	+	d
ウレアーゼテスト	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-
ONPG	-	-	-
VP	-	-	-
マッコンキー寒天	+	+	-
インドール形成	-	-	-

【0011】表1～表3に示される菌学的性質からこのJ1104株はシュードモナス属アエルギノサ種に属するものと同定された。このJ1104株は生命工学工業技術研究所に第12180号として寄託されている。なお、この微生物はトリクレンの他、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼンなどに作用してそれらを分解できる。

【0012】実施例1。以下、この発明の一実施例を図について説明する。シュードモナス、アエルギノサJ1104

104を、ぶどう糖を炭素源とした100mlのMSB培地で、一夜前培養した後、増殖した菌体を遠心分離機で集菌して、再びMSB培地に懸濁して濁度を1.0に合わせた。この菌体懸濁液2mlを、ふっ素樹脂でコートしたゴム栓付きの内容積13.4mlの血液バイアルに、分取し密閉して、これにトリクレンを20 $\mu$ g加えて25℃で約24時間培養した。この培養期間において、経時的に気相を採取して気相中のトリクレンの濃度を測定した。ここで、トルエンの培地への添加の有無に

よる J I 1 0 4 のトリクレン分解能力への影響を調べるため、前培養と本培養の両方の培地にトルエンを最終濃度 2 mM になるように加えた場合、前培養の培地のみトルエンを最終濃度 2 mM になるように加えた場合、又は前培養及び本培養の培地のいずれにもトルエンを加えない場合についてトリクレン分解能力を測定した。それぞれの場合において、本培養でトリクレンを加えている。

【0013】結果を図1に示す。図において、縦軸は分解されずに残っていた残存トリクレンの割合を%で表し、横軸は培養時間を分単位で表している。実線は前培養と本培養の両方の培地にトルエンを加えた場合、点線は前培養の培地のみトルエンを加えた場合、○は前培養及び本培養のいずれの培地にもトルエンを加えない場合の結果を示す。前培養、本培養のいずれにもトルエンを加えなかったものではトリクレンの分解は極めて遅く、トルエンを加えて前培養し、本培養でトリクレンのみを加えたものでは最初の分解速度は高いが、分解速度は時間と共に低下した。前培養、本培養の両方にトルエンを加え、本培養でトリクレンを加えたものでは、最初 4 時間 (240 分) 程度の無駄時間を経た後に急速な分解が起こり、約 10 時間 (600 分) 後には検出できなくなった。このことより J I 1 0 4 のトリクレン分解には、トルエンなどの芳香族炭化水素の添加が必要であることがわかる。また、前培養にトルエンを加えるだけでなく、本培養でもトルエンを加えた方がトリクレンの分解は良好であった。トリクレンの減少量は気液でトリクレンが平衡状態であるとして計算した。

【0014】実施例2. トリクレンの分解能力それ自体は既に他のシュードモナス属の菌株で幾つか報告されている。J I 1 0 4 に加えて、そのうちの3株、シュードモナス、メンドシナ KR 1、シュードモナス、セバシア G 4 およびシュードモナス、プチダ F 1 を用いてトリクレンの分解実験を行った。実験条件は実施例1と同様で、前培養、本培養共にトルエンを加えた。測定結果を図2に示す。図において、縦軸は分解されずに残っていた残存トリクレンの割合を%で表し、横軸は培養時間を分単位で表している。実線は J I 1 0 4、○はシュードモナス、セバシア G 4、x はシュードモナス、メンドシナ KR 1、点線はシュードモナス、プチダ F 1 の結果を

示す。

【0015】図2から明らかなように、4種の微生物は全てトリクレンを分解する。J I 1 0 4 では、トリクレンは培養開始後4時間(240分)程の遅れの後急速に減少し10時間(600分)後には検出できなくなっている。J I 1 0 4 が他の3株より分解速度が速く優れたトリクレン分解能力があるのがわかる。これらのデータは培養の最適化を行っていない段階のことであるが、J I 1 0 4 が最も優れた菌株であることがわかる。

【0016】また、シュードモナス、メンドシナ KR 1、シュードモナス、セバシア G 4 およびシュードモナス、プチダ F 1 でも、トリクレン分解速度はいずれの株においてもトルエンの同時添加の有無に大きく依存しており、トルエンが無いとトリクレンの分解は著しく遅くなることがわかった。すなわち、これらの菌株でも、トリクレンの分解はトルエン、ベンゼン、キシレンなどの芳香族炭化水素の分解に係わる酵素群により行われているので、そのトルエン分解酵素発現のために、トリクレンを分解する前にトルエン等を微量含んだ培地で培養して誘導する必要がある。

【0017】

【発明の効果】以上のように、請求項1の発明によれば、トリクレン分解能力を有する微生物をトリクレンを含有する培地で好気的に培養するので、経済的に微生物がトリクレンを分解できる。

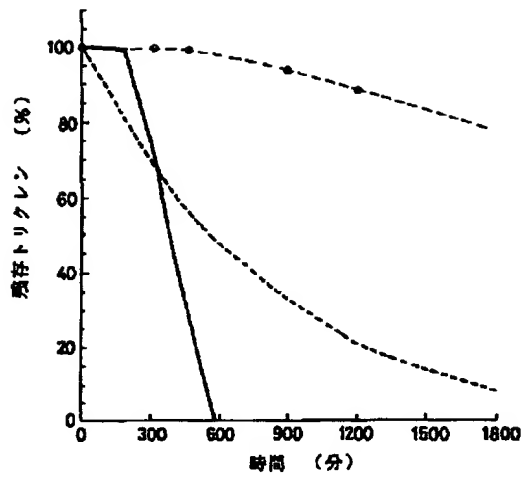
【0018】請求項2の発明によれば、トリクレン分解能力を有するシュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 をトリクレンを含有する培地で好気的に培養するので、シュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 がトリクレンを分解できる。さらに、シュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 は分解速度が速いため効率的にトリクレンを分解できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】請求項2の発明に用いられるシュードモナス、アエルギノサ J I 1 0 4 によるトリクレン分解測定結果を示すグラフ図である。

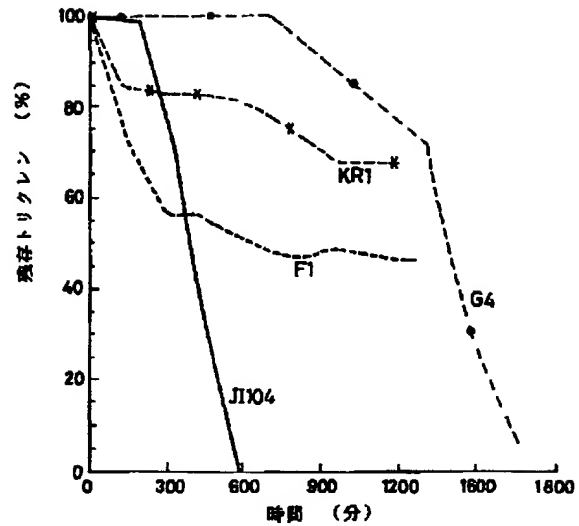
【図2】請求項1の発明に用いられるトリクレン分解能力を有する微生物によるトリクレン分解測定結果を示すグラフ図である。

【図1】



——前培養, 本培養でトルエン有  
 ----前培養でトルエン有, 本培養でトルエン無  
 -●-前培養, 本培養でトルエン無

【図2】



——J1104  
 -●-シュードモナス, セバシアG4  
 --\*--シュードモナス, メンドシナKR1  
 ----シュードモナス, プチダF1

フロントページの続き

(51)Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:385)

(72)発明者 森田 晴彦

東京都新宿区戸山1-20-1